

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนํ้านมดิบ ด้วยเทคนิค ELISA

รณิดา เหลืองประเสริฐ เนาวรัตน์ กำภูศิริ นิพัทธา พรหมอินทร์
มิ่งตาน อ้อสงษ์ วิสุมน บางเมือง

บทคัดย่อ

การศึกษาพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนํ้านมดิบ ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้หลักการ Competitive enzyme immunoassay เป็นวิธีทดสอบเพื่อหาการปนเปื้อนของสาร Aflatoxin ชนิด M₁ ในนํ้านมดิบ ที่มาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายของโคนมและหลังออกมาทางนํ้านม ตามแนวทางของ Eurachem/2014 การประมาณค่าขีดจำกัดในการตรวจหา (Limit of Detection) เท่ากับ 0.004 ไมโครกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantification) เท่ากับ 0.010 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่เมื่อทำการยืนยันค่าขีดจำกัดในการตรวจหา (Limit of Detection) ผลปรากฏว่า ขีดจำกัดในการตรวจหา เท่ากับ 0.010 µg/L และศึกษาการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ด้วยเทคนิค ELISA กับเทคนิค LC-MS/MS จำนวน 10 ตัวอย่าง เมื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้สถิติ Paired t-test ปรากฏว่า ค่า $t_{\text{stat}} < t_{\text{critical}}$ แสดงว่า วิธีตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนํ้านมดิบ ด้วยเทคนิค ELISA และเทคนิค LC-MS/MS ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค ELISA เป็นเพียงการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นเท่านั้น สามารถยืนยันผลการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC-FLD หรือเทคนิค LC-MS/MS ดังนั้น วิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบในนํ้านมดิบ ด้วยเทคนิค ELISA ต่อไปได้

คำสำคัญ: Aflatoxin M₁ นํ้านมดิบ ELISA

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

**Method development of Screening method of Aflatoxin M₁ in raw milk
by ELISA technique**

Ramida Luengprasert Naovarat Kamposiri Nipattthra Phromma-in
Mangtan Oswong Wisumon Bangmeaung

Abstract

A study aims to develop a screening method of Aflatoxin M₁ in raw milk by ELISA technique (Competitive enzyme immunoassay). The Aflatoxin M₁ was produced from metabolite process in dairy cows and secreted through milk. According to Eurachem/2014, The estimating limit of detection and the estimating limit of quantification were 0.004 µg/L and 0.010 µg/L respectively, while the limit of detection was 0.010 µg/L in the practical. The comparison study between ELISA and LC-MS/MS technique for 10 samples was found that the results from both techniques have no difference with significant when evaluating with paired t-test (Statistic data analysis: $t_{\text{stat}} < t_{\text{critical}}$). However, the ELISA technique is just a screening method. Both qualitative and quantitative analysis can be confirmed by HPLC-FLD or LC-MS/MS techniques. Therefore, the method validation can be continued in further.

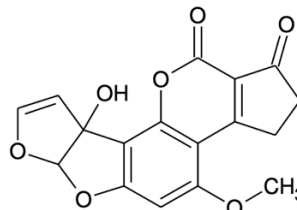
Keywords: Aflatoxin M₁, Raw milk, ELISA

Milk and milk products Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

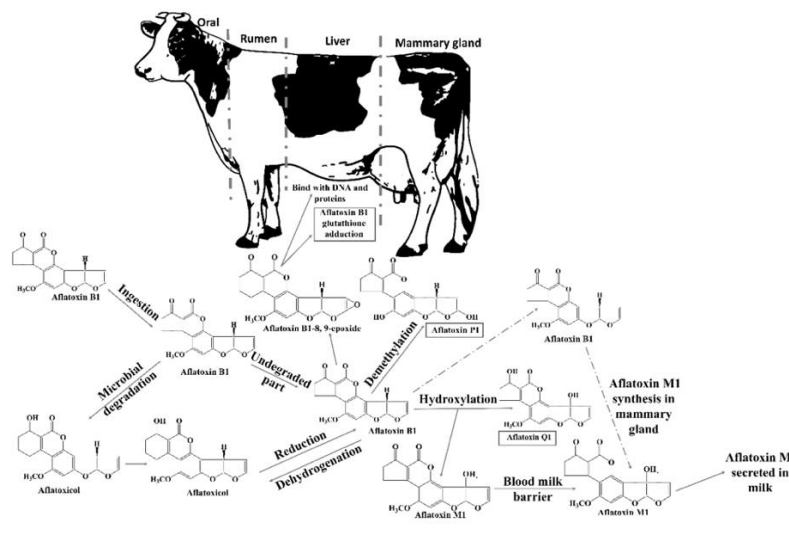
บทนำ

สารพิษที่เกิดจากเชื้อรา (Mycotoxins) คือ สารพิษธรรมชาติที่สร้างจากเชื้อรา การปนเปื้อนนี้มักเกิดขึ้นในผลิตผลทางการเกษตร เกิดขึ้นได้ตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา และกระบวนการผลิต เมื่อคนหรือสัตว์ได้รับสารพิษจากเชื้อราเข้าไปแม้ในปริมาณน้อยก็ทำให้เกิดอาการพิษ (Mycotoxicosis) สารพิษที่เป็นที่รู้จักมากที่สุด คือ อะฟลาทอกซิน เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งพบได้ตามธรรมชาติทั้งในดินและอากาศ มีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี₁ (AFB₁) อะฟลาทอกซินบี₂ (AFB₂) อะฟลาทอกซินจี₁ (AFG₁) และ อะฟลาทอกซินจี₂ (AFG₂) (อภิษฐา, 2562) สำหรับสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อราเพื่อสร้างสารอะฟลาทอกซิน ได้แก่ อุณหภูมิในช่วง 25-35 °C ในสภาวะกรด ความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 83% ถึง 88% มีโลหะ เช่น แมกนีเซียม สังกะสี และแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ซูโครส หรือฟรุกโตสที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน (Seid and Mama, 2019)

นอกจากจะพบอะฟลาทอกซินได้ในผลิตผลทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสง ข้าวสาลี ฯลฯ ยังสามารถพบได้ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมอีกด้วย โดยชนิดของอะฟลาทอกซินที่พบได้ในน้ำนม คือ อะฟลาทอกซินเอ็ม₁ (AFM₁) เป็นสารอนุพันธ์จากเมทาบอลิซึมของอะฟลาทอกซินบี₁ (AFB₁) โดยเอนไซม์ภายในเซลล์ตับของโคนมที่บริโภคอาหารสัตว์ที่มีการปนเปื้อน AFB₁ เข้าไป บางส่วนถูกสะสมในร่างกาย บางส่วนถูกขับออกจากร่างกายทางอุจจาระ ปัสสาวะ และทางน้ำนม (ดวงจันทร์และวนิดา, 2545) ซึ่งการปนเปื้อน AFM₁ ในน้ำนม ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคน้ำนมโดยตรง



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ AFM₁



รูปที่ 2 Metabolism pathways ของ AFB₁ ภายในเซลล์ตับของโคนม (Martina et al., 2022)

จากการอ้างอิงตามข้อกำหนดของตาม Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 และ Codex Alimentarius International food standards ได้มีการกำหนดค่า Maximum level (ML) ของ AFM₁ ในน้ำนม ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs section 2
Mycotoxins (European Commission, 2006)

Section 2: Mycotoxins

Foodstuffs (1)		Maximum levels (µg/kg)		
2.1	Aflatoxins	B ₁	Sum of B ₁ , B ₂ , G ₁ and G ₂	M ₁
2.1.1	Groundnuts to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	8,0 (2)	15,0 (2)	—
2.1.2	Nuts to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	5,0 (2)	10,0 (2)	—
2.1.3	Groundnuts and nuts and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	2,0 (2)	4,0 (2)	—
2.1.4	Dried fruit to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	5,0	10,0	—
2.1.5	Dried fruit and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	2,0	4,0	—
2.1.6	All cereals and all products derived from cereals, including processed cereal products, with the exception of foodstuffs listed in 2.1.7, 2.1.10 and 2.1.12	2,0	4,0	—
2.1.7	Maize to be subjected to sorting or other physical treatment before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	5,0	10,0	—
2.1.8	Raw milk (2), heat-treated milk and milk for the manufacture of milk-based products	—	—	0,050

ตารางที่ 2 Maximum level of Aflatoxin M₁ in milks (Codex, 2023)

CXS 193-1995

42

AFLATOXIN M₁	Reference to JECFA:	56 (2001)
	Toxicological guidance value:	Cancer potency estimates at specified residue levels (2001, Using worst-case assumptions, the additional risks for liver cancer predicted with use of proposed maximum levels of aflatoxin M ₁ of 0.05 and 0.5 µg/kg are very small. The potency of aflatoxin M ₁ appears to be so low in HBsAg- individuals that a carcinogenic effect of M ₁ intake in those who consume large quantities of milk and milk products in comparison with non-consumers of these products would be impossible to demonstrate. Hepatitis B virus carriers might benefit from a reduction in the aflatoxin concentration in their diet, and the reduction might also offer some protection in hepatitis C virus carriers).
	Contaminant definition:	Aflatoxin M ₁
	Synonyms:	AFM ₁
	Related code of practice:	Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin B ₁ in Raw Materials and Supplemental Feedingstuffs for Milk Producing Animals (CXC 45-1997)

Commodity/ Product name	Maximum level (ML) µg/kg	Portion of the commodity/ Product to which the ML applies	Notes/Remarks
Milks	0.5	Whole commodity	Milk is the normal mammary secretion of milking animals obtained from one or more milkings without either addition to it or extraction from it, intended for consumption as liquid milk or for further processing. A concentration factor applies to partially or wholly dehydrated milks.

วิธีวิเคราะห์ AFM₁ หลักๆโดยทั่วไป ได้แก่ วิธีทางโครมาโตกราฟี (Chromatography) และวิธีทางอิมมูโนเคมี (Immunochemical) สำหรับเทคนิค Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีทางอิมมูโนเคมี ซึ่งเป็น Rapid screening test ข้อดีของ ELISA คือ ทราบผลเร็ว สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณในตัวอย่างที่มี Analyte ปริมาณต่ำๆได้ และราคาถูกกว่าเมื่อเทียบกับวิธีทางโครมาโตกราฟีซึ่งใช้เทคนิค/เครื่องมือขั้นสูง เช่น HPLC-FLD, LC-MS/MS

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนํ้านมดิบ ด้วยเทคนิค Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay หรือ ELISA เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังปริมาณ AFM₁ ที่อาจพบได้ในตัวอย่างนํ้านมดิบของสมาชิกในพื้นที่เขต 1 สำหรับใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาคุณภาพของนํ้านมดิบต่อไป

เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีและสารมาตรฐาน

1. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย ขนาด 100 μ L และ Tips
2. เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ 5 mL และ Tips
3. เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ ขนาด 8 ช่อง
4. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก (Microcentrifuge)
7. เครื่องกวนสารละลาย (Stirrer) พร้อม Magnetic bar
8. เครื่องล้างอีไลซ่าเพลท (ELISA Washer)
9. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate Reader)
10. Spatula
11. Centrifuge tube ขนาด 15 mL
12. Parafilm
13. อะลูมิเนียมฟอยล์
14. ชุดทดสอบ Plus Aflatoxin M₁ Fast ELISA ยี่ห้อ Europroxima

วิธีดำเนินการ

การเตรียมตัวอย่าง

นํ้านมดิบที่เก็บได้มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) โดยเครื่องกวนสารละลาย (Stirrer) นาน 30 นาที จากนั้น ปิเปตตัวอย่างนํ้านมดิบลงในหลอด Centrifuge ปริมาตร 5 mL และนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ด้วยแรงขนาด 2000xg อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที ใช้ Spatula ตักชั้นไขมันที่ลอยอยู่ด้านบนออก และดูดสารละลายส่วนล่าง (Defatted milk) ปริมาตร 100 μ L ใส่ลงใน 96-well plate

การเตรียม Reagent

1. Sample dilution buffer ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และผสมให้เข้ากันอย่างแรง ด้วย vortex mixer
2. Rinsing buffer (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน) เตรียม rinsing buffer: น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:19 เช่น ต้องการเตรียมปริมาตร 50 mL จะต้องผสม rinsing buffer ปริมาตร 2.5 mL กับ น้ำกลั่น ปริมาตร 47.5 mL และผสมให้เข้ากัน

3. Conjugate solution (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน) spin down ขวด vial ที่บรรจุ conjugate solution ด้วยแรงขนาด 1000xg นาน 1 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก จากนั้น pipette conjugate solution ปริมาตร 50 μL และเติม dilution buffer จนมีปริมาตร 5 mL และผสมให้เข้ากัน

4. Substrate solution นำออกมาตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง และผสมให้เข้ากันก่อนใช้งาน

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. pipette Zero standard (H1, H2, A1, A2), Standard solution และตัวอย่างลงในหลุมปริมาตร 100 μL
2. ปิดผนึก plate ด้วย parafilm และเขย่า 2 - 3 นาที ด้วย shaker
3. บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาทีในที่มืด
4. นำสารละลายใน plate ออกและล้างด้วย Rinsing buffer 3 ครั้ง
5. pipette Conjugate ปริมาตร 100 μL ลงในทุกหลุม ยกเว้นหลุม H1 และ H2
6. ปิดผนึก plate ด้วย parafilm และเขย่า 2 - 3 นาทีด้วย shaker
7. บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ นาน 15 นาทีในที่มืด
8. นำสารละลายใน plate ออกและล้างด้วย rinsing buffer 3 ครั้ง
9. pipette Substrate solution ปริมาตร 100 μL ลงในทุกหลุม และบ่ม plate ที่อุณหภูมิ 20 - 25 $^{\circ}\text{C}$ นาน 15 นาที
10. เติม Stop solution ปริมาตร 100 μL ลงในทุกหลุม
11. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร
12. บันทึกผลและคำนวณวิเคราะห์ผลทดสอบ

การสร้าง Standard curve

เพื่อทดสอบ Sensitivity ของชุดทดสอบ ทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ของสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีอยู่ในชุดทดสอบ (Standard solution) ดังนี้ 0, 6.25, 12.50, 25, 50, 100 และ 200 pg/mL จากนั้นนำค่าที่ได้มาพลอตกราฟ

กำหนดให้ แกน X คือ ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายมาตรฐาน (logarithmic X-axis)

แกน Y คือ ร้อยละของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างต่อค่าการดูดกลืนแสงของ Blank ($\%B/B_0$)

เมื่อพลอตกราฟออกมา ควรมีค่า Determination of determination (R^2) มากกว่า 0.995 และสามารถหาช่วงของการใช้งานได้จากช่วงของ Standard curve ที่เป็นเส้นตรง

การประมาณค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ) ของวิธีทดสอบ

วิเคราะห์ Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแต่ละซ้ำจาก Standard curve เพื่อหาค่าเฉลี่ย และนำไปลบกับค่าความเข้มข้นแต่ละซ้ำ (Corrected value) จากนั้นหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่ถูกต้อง (S_0) เพื่อคำนวณหา S_0' จาก

$$S_0' = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$$

เมื่อ n คือ จำนวนการวัดซ้ำเฉลี่ย

n_b คือ จำนวนของการวัดแปลงค์ที่ใช้คำนวณค่าแก้

คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบ จากสูตร

$$\begin{array}{lcl} \text{LOD} & = & 3S_0' \\ \text{LOQ} & = & 10S_0' \end{array}$$

การยืนยันค่า LOD ของชุดทดสอบ

ทำการวัด Reagent blank จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อหาค่า Mean+3SD และเตรียม Fortified sample ให้มีระดับของ Aflatoxin M_1 เท่ากับค่า LOD ที่คำนวณได้ และทำการทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ โดยต้องมีผลทดสอบซ้ำเป็น False negative $\leq 5\%$

การเปรียบเทียบวิธีทดสอบระหว่างเทคนิค ELISA กับเทคนิค LC-MS/MS

วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันดิบด้วยเทคนิค ELISA และเทคนิค LC-MS/MS และวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) ด้วยโปรแกรม Microsoft excel โดยใช้สถิติ t-test: Paired Two Sample for Means โดยการแปรผลการวิเคราะห์ข้อมูลได้ ดังนี้

- ค่า $t_{\text{stat}} < t_{\text{critical}}$ แสดงว่า วิธีทดสอบทั้ง 2 วิธีให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
- ค่า $t_{\text{stat}} \geq t_{\text{critical}}$ แสดงว่า วิธีทดสอบทั้ง 2 วิธีให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลอง

การประมาณค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ) ของวิธีทดสอบ

จากการวิเคราะห์ Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการประมาณค่า LOD, LOQ ของวิธีวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนํ้ามันดิบ ด้วยเทคนิค ELISA

Replicate	Concentration (µg/L)	Corrected value (µg/L)
1	0.0069	-0.0008
2	0.0077	0.0000
3	0.0076	-0.0001
4	0.0079	0.0002
5	0.0082	0.0005
6	0.0065	-0.0013
7	0.0068	-0.0009
8	0.0105	0.0028
9	0.0076	-0.0001
10	0.0078	0.0001
$\bar{x}$	0.0077	
S_0		0.0011
S_0'		0.0011
LOD		$0.0034 \approx 0.004$
LOQ		$0.0112 \approx 0.010$

จากการคำนวณตามแนวทางของ Eurachem (2014) ขีดจำกัดของการตรวจหา (LOD) ของวิธีทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.004 µg/L และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.010 µg/L ซึ่งสามารถนำค่าที่คำนวณได้ใช้เป็นแนวทางในการ Fortified Sample ในขั้นตอนต่อไปได้

การยืนยันค่า LOD ของชุดทดสอบ

ทำการวัดค่า Absorbance ของ Reagent blank (Zero standard solution) จำนวน 10 ซ้ำ แสดงผลตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ข้อมูลการวัด Absorbance ของ Reagent blank

Replicate	Absorbance
1	2.330
2	2.262
3	2.206
4	2.252
5	2.269
6	2.219
7	2.336
8	2.431
9	2.264
10	2.240
mean	2.281
SD	0.067
3SD	0.202
mean+3SD	2.483

ในขั้นตอนนี้ ได้ทำการ Fortified sample ให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ ค่าขีดจำกัดการตรวจหาที่คำนวณได้ จากข้อ 9.1 แต่ยังพบ False negative มากกว่า 5% ดังนั้น จึงเพิ่มระดับความเข้มข้นในการทำ Fortified sample เป็น 0.010 $\mu\text{g/L}$ ดังแสดงผลที่ได้ตามตารางที่ 5 พบว่า ค่า Absorbance ทั้ง 10 ซ้ำ ไม่มีค่าใดมากกว่า Mean+3SD ของ Reagent blank เท่ากับ 2.483 ตามตารางที่ 4 (ไม่พบ False negative) เนื่องจาก ชุดทดสอบที่ใช้ทำงานด้วยหลักการ Competitive enzyme immunoassay (ความเข้มข้นของ Analyte มาก สัญญาณที่อ่านได้ต่ำ ในทางกลับกันเมื่อความเข้มข้นของ Analyte น้อย สัญญาณที่อ่านได้สูง) ดังนั้น ค่าขีดจำกัดในการตรวจหา ต้องมีค่าไม่เกินค่าเฉลี่ยสัญญาณที่วัดได้จาก Reagent blank ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.7% (Mean+3SD) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ขีดจำกัดของการตรวจหา (Limit of Detection) มีค่าเท่ากับ 0.010 $\mu\text{g/L}$

ตารางที่ 5 ข้อมูลการวัด Absorbance ของน้ำนมที่มีการ Fortified sample ที่ 0.010 µg/L

Replicate	Absorbance
1	2.368
2	2.354
3	2.351
4	2.390
5	2.293
6	2.433
7	2.415
8	2.357
9	2.358
10	2.201

การการเปรียบเทียบวิธีทดสอบระหว่างเทคนิค ELISA กับเทคนิค LC-MS/MS

ทำการรวบรวมข้อมูลผลวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในน้ำนมดิบที่ได้ทั้ง 2 วิธี จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในน้ำนมดิบด้วยเทคนิค ELISA และเทคนิค LC-MS/MS

Sample	Concentration of Aflatoxin M ₁ โดยเทคนิค LC-MS/MS (µg/L)	Concentration of Aflatoxin M ₁ โดยเทคนิค ELISA (µg/L)
1	0.0140	0.0151
2	0.0120	0.0095
3	0.0042	0.0059
4	0.0096	0.0072
5	0.0080	0.0057
6	0.0120	0.0139
7	0.0070	0.0063
8	0.0160	0.0131
9	0.0034	0.0028
10	0.0350	0.0541

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) ด้วยโปรแกรม Microsoft excel โดยใช้สถิติ t-test: Paired Two Sample for Means ผลแสดงตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงการวิเคราะห์ผลข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft excel โดยใช้สถิติ t-test: Paired Two Sample for Means

t-Test: Paired Two Sample for Means		
	LC-MS/MS (µg/L)	ELISA (µg/L)
Mean	0.01212	0.01334885
Variance	8.11573E-05	0.000221077
Observations	10	10
Pearson Correlation	0.969437474	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	9	
t Stat	-0.59589502	
P(T<=t) one-tail	0.282963984	
t Critical one-tail	1.833112933	
P(T<=t) two-tail	0.565927968	
t Critical two-tail	2.262157163	

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ คือ ค่า $t_{\text{stat}} < t_{\text{critical}}$ แสดงว่า การตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin M_1 ในน้ำมันดิบ ด้วยเทคนิค ELISA และ LC-MS/MS ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม เทคนิค ELISA เป็นเพียงการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นเท่านั้น ควรทำการยืนยันผลการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC-FLD หรือเทคนิค LC-MS/MS ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin M_1 ในน้ำมันดิบ ด้วยเทคนิค ELISA พบว่า จากการคำนวณตามแนวทางของ Eurachem (2014) ขีดจำกัดของการตรวจหา (LOD) ของวิธีทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.004 µg/L และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.010 µg/L แต่เมื่อทำการทดสอบเพื่อยืนยันค่าขีดจำกัดในการตรวจหา (Limit of Detection) ของวิธีทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.010 µg/L โดยดูจากค่าสัญญาณของเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทของ Fortified sample ที่ 0.010 µg/L จำนวน 10 ซ้ำ ไม่พบผลลบปลอม (False negative) และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ Aflatoxin M_1 ในน้ำมันดิบด้วยเทคนิค ELISA และ LC-MS/MS จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้สถิติ Paired t-test พบว่า การตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin M_1 ในน้ำมันดิบ ด้วยเทคนิค ELISA และ LC-MS/MS ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ข้อเสนอแนะ

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิธีตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในน้ำนมดิบ ควรมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อใช้ในการยืนยันผล (Confirmatory method) ด้วยเทคนิคขั้นสูง เช่น เทคนิค Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เทคนิค High performance liquid chromatography-Fluorescence detector (HPLC-FLD) ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรกลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำหรับความร่วมมือในการศึกษาครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ดวงจันทร์ สุประเสริฐ และ วนิดา ยุธยาติ. 2545. สารพิษอฟลาทอกซินเอ็ม1ที่ปนเปื้อนในนมโคและนมถั่วเหลือง. **วารสารสัตวแพทย์** ปีที่ 12 ฉบับที่ 2: 1-7.
- อภิษฐา ช่างสุพรรณ, เอกภพ นิ่มเล็ก, ผกาวัล เวชชัยยา. การควบคุมคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์เพื่อลดการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินเอ็ม₁. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ**: 21-23.
- Codex Alimentarius International Food Standards. *General standard for contaminants and toxins in food and feed CXS193-1995 (Amended in 2023)*: 42.
- Eurachem Guide., 2014 The fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method validation and Related Topic, Second Edition 2014.
- European Commission. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L364/15.
- Seid, A., Mama, A. (2019): Aflatoxicosis and Occurrence of Aflatoxin M₁ (AFM₁) in Milk and Dairy Products: A Review. **Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, 6 (1): 1054.
- Martina A., Marija T., Antonija S., Mirela C., Jurislav B. and Tihomir K. 2022. Aflatoxin M₁ in milk and dairy products- A mini review. **Croatian Journal of Food Science and Technology**, 14 (2): 235-248.